



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Epiteliocystis på laxfisk

Potentiella bakteriella agens och sjukdomens
betydelse för laxnäringen

Epitheliocystis in salmonids

Potential bacterial agents and the impact of the
disease on the salmon industry

Linda Nyqvist

Uppsala
2019

Epitheliocystis på laxfisk

Potentiella bakteriella agens och sjukdomens betydelse för laxnäringen

Epitheliocystis in salmonids

Potential bacterial agents and the impact of the disease on the salmon industry

Linda Nyqvist

Handledare: *Ingrid Hansson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap; Enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0862

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *epitheliocystis, lax, laxodling, PGI, proliferativ gälinflammation, candidatus Piscichlamydia salmonis, candidatus*

Clavochlamydia salmonicola, Candidatus Branchiomonas cisticola

Keywords: *epitheliocystis, salmon, salmonids, salmon farming, aquaculture, PGI, proliferative gill inflammation, candidatus Piscichlamydia salmonis, candidatus Clavochlamydia salmonicola, Candidatus Branchiomonas cisticola*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLL

| | |
|---|----|
| Sammanfattning | 1 |
| Summary | 2 |
| Inledning | 3 |
| Material och metoder | 3 |
| Litteraturoversikt | 3 |
| Laxfiskar och fiskanatomi | 3 |
| <i>Laxens livscykel</i> | 3 |
| <i>Gälanatomi och gälfysiologi</i> | 3 |
| Epiteliocystis | 4 |
| <i>Prevalens</i> | 5 |
| <i>Klamydiabakterier</i> | 5 |
| <i>En nyupptäckt betaproteobakterie</i> | 6 |
| Spridning | 7 |
| <i>Horisontell överföring</i> | 7 |
| <i>Miljöfaktorer</i> | 7 |
| <i>Putsarfiskar</i> | 8 |
| Behandling | 8 |
| <i>Antibiotika</i> | 8 |
| <i>Probiotika</i> | 9 |
| Diskussion | 10 |
| Agens | 10 |
| Prevalens och spridning | 10 |
| Antibiotikaanvändning på fisk | 10 |
| Begränsad forskning i ett fåtal länder | 10 |
| Litteraturförteckning | 12 |
| Icke publicerat material | 14 |

SAMMANFATTNING

Laxodling är en betydelsefull industri för ett flertal länder och därför är det viktigt att öka kunskapen om de sjukdomar som förekommer på den odlade fisken. Epiteliocystis är ett tillstånd som setts på många olika fiskarter världen över, däribland lax. Fokus för denna litteraturstudie ligger på att karakterisera epiteliocystis och hur det manifesteras på laxfiskar. Vidare behandlas agens, potentiella spridningsvägar och de behandlingar som förekommer i dagsläget.

Epiteliocystis kännetecknas av cystor i gälepitelceller och kan ses både som subkliniska och kliniska infektioner. Epiteliocystis ingår i etiologin för proliferativ gälinflammation, ett sjukdomstillstånd kännetecknat av respirationspåverkan som har hög dödlighet under särskilda omständigheter. Kliniska infektioner kan leda till produktionsbortfall i form av försämrad tillväxt och avlidna fiskar.

Prevalensen för epiteliocystis varierar över världen och har setts på både odlad och vild lax. Studier har visat på en säsongsvariation där prevalensen är som högst under sommarmånaderna och det finns indikationer på att agens som orsakar epiteliocystis persisterar naturligt i miljön för att återintroduceras till fiskpopulationerna årligen.

Hittills har tre bakteriella agens påvisats i samband med epiteliocystis varav alla har klassats som nyupptäckta arter. De två första arterna som identifierades uppvisar tydligt de utvecklingsstadier som är utmärkande för klamydiabakterier. Den ena, *Candidatus Piscichlamydia salmonis* har identifierats i både vilda och odlade populationer i såväl sötvatten som saltvatten medan den andra, *Candidatus Clavochlamydia salomincola*, påvisats i vilda och odlade populationer men endast i sötvatten. Förutom dessa klamydiabakterier har en betaproteobakterie, *Candidatus Branchiomonas cisticola* identifierats på odlade populationer i saltvatten.

Såväl *Ca. B. cisticola* som *Ca. P. salmonis* har visats kunna överföras horisontellt via vattnet. Indikationer finns även på att dessa agens persisterar i värdar i miljön. Epiteliocystis har påvisats på många olika fiskarter men de agens som orsakar tillståndet är värdspecifika vilket innebär att tillståndet inte smittar mellan fiskar som inte är nära släkt.

Det finns för närvarande ingen effektiv behandling mot epiteliocystis hos laxfiskar men antibiotika har visats ha effekt på andra arter. Om det i framtiden skulle forskas fram en effektiv antibiotikabehandling mot tillståndet väcker det frågan kring antibiotikaanvändning och hur resistensutvecklingen kan hållas nere.

För att öka förståelsen för epiteliocystis krävs mer forskning kring vilka förutsättningar som predisponerar för tillståndet och vilka behandlingar som kan vara effektiva.

SUMMARY

Salmon farming is an important industry for a number of countries, and it is therefore important to broaden the knowledge on the diseases that occur in the farmed populations. Epitheliocystis is a condition that has been identified on several different species of fish, including salmonids. The focus of this review is to characterize epitheliocystis and how it manifests in salmonids, the bacterial agents, potential modes of transmission and whether or not there are any available treatments.

Epitheliocystis is characterized by cysts in the gill epithelium and can manifest as both clinical and subclinical infections. Epitheliocystis is included in the multifactorial etiology of proliferative gill inflammation, which is a respiratory disease that can have a high mortality under certain circumstances. Clinical infections of epitheliocystis can lead to production losses in terms of impaired growth and deceased fish.

The prevalence of epitheliocystis varies globally and it has been seen both in wild and farmed populations. Studies have shown seasonal variations with the highest prevalence of disease in the summer months and there are indications that the causative agents persist in the environment and are reintroduced to the salmonid populations yearly.

Thus far, three bacterial agents have been identified in correlation to epitheliocystis in salmonids. All of these have been classified as new species. The first two clearly demonstrate the distinct developmental stages of chlamydia bacteria. *Candidatus Piscichlamydia salmonis* has been found in both wild and farmed populations in both fresh and sea water. *Candidatus Clavochlamydia salmonicola* has also been seen in both wild and farmed populations but only in freshwater. Apart from these chlamydia bacteria, a betaproteobacteria, *Candidatus Branchiomonas cisticola*, has been detected in farmed populations.

Both *Ca. P. salmonis* and *Ca. B. cisticola* have been shown to transmit horizontally between fishes. There are also indications that the bacterial agents persist naturally in the environment. Even though epitheliocystis affects many different species of fish, the bacteria causing the condition seems to be host specific, which means that the condition does not transmit between fish that is not closely related.

Epitheliocystis has so far not been treated successfully in salmonids but antibiotics have been effective in treating the condition in other species. If a successful antibiotic treatment was to be developed in the future, that would raise the question on antibiotic resistance and how to administer medication in a way that will minimize the risk of furthering this development.

To further the knowledge on epitheliocystis in salmonids, more research is needed on under what circumstances the condition occurs and on potential effective treatments.

INLEDNING

Laxen är en populär matfisk världen över. Norge är den största producenten av lax i världen och laxproduktionen står för en stor del av landets totala exportintäkter. Både för att främja djurhälsan och för att minimera ekonomiska förluster är det viktigt att öka kunskapen om olika sjukdomstillstånd och vad som kan göras för att minimera prevalensen. Ett sjukdomstillstånd som setts på flertalet fiskarter är epiteliocystis. Epiteliocystis manifesteras som cystor i gälepitelet och kan vid intensiva infektioner ge respirationspåverkan. Syftet med denna studie är att kartlägga kunskapen om epiteliocystis och undersöka hur sjukdomsläget ser ut på framför allt den odlade laxen. Vilka agens orsakar tillståndet, hur sprids dessa och vilka faktorer kan påverka prevalens? Finns det några behandlingar eller preventiva åtgärder att ta till?

MATERIAL OCH METODER

Litteraturen har sökts fram via flertalet databaser, främst Web of Science, PubMed och ASFA. Sökorden har framför allt varit "epitheliocystis" AND "salmon*" både med och utan tillägget "aquaculture OR farmed".

LITTERATURÖVERSIKT

Laxfiskar och fiskanatomi

Laxens livscykel

Laxar är anadroma fiskar, vilket innebär att de fortplantar sig i färskvatten men vandrar ut till saltvatten när de mognat, där de sedan lever till de är könsmogna och kan fortplanta sig. Äggen kläcks i sötvatten, där den juvenila laxen utvecklas från yngel, till stirr och sedan till smolt, som är det stadie då laxen går från att vara anpassad till sötvatten till att vandra ut i saltvatten. Det finns dock populationer av lax som lever hela sina liv i sötvatten (Artdatabanken, 2015). Inom odlingen kläcks äggen i slutna sötvattensystem, där de får leva tills de nått en målvikt och är redo att flyttas till saltvatten. Enligt uppgifter från norska Havforskningsinstitutet tar det generellt 8-18 månader för smolten att nå en målvikt på 100 gram, varpå den flyttas till saltvattenkassar i de norska fjordarna. Tillväxten är till stor del beroende på vattentemperatur och foder (Havforskningsinstitutet, 2009).

Det är framför allt atlantlax, *Salmo salar*, som odlas i Norge. Andra laxarter som odlas i Norden är öring (*Salmo trutta*) och regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*). Under 2017 producerades 1,3 miljoner ton odlad fisk i Norge, varav atlantlax stod för 94,4% av den vikten (Statistisk sentralbyrå, 2018), vilket gör Norge till den största laxproducenten i världen (FAO, 2018). Internationellt förekommer även odling av kungslax (*Oncorhynchus tshawytscha*). Laxodling är koncentrerat till några få länder i världen. Utöver Norge producerar Chile, Kanada, Skottland, Färöarna och Australien mycket lax (Asche et al., 2013).

Gälanatomi och gälfysiologi

Fiskar skiljer sig från andra djur på så sätt att de förser sig med syre via gälarna. Laxar är benfiskar vilka har fyra respiratoriska gälbågar och en icke-respiratorisk båge på vardera sida. Gälarna täcks av ett lock som kallas operculum och fungerar som ett skydd för den viktiga strukturen. Från gälbågarna utgår rader av tunna långa filament som i sin tur är täckta av lameller, se figur 1. Lamellerna är små fjälllika strukturer i vilka blodet syresätts. Uppbyggnaden av gälarna ger en stor area och därmed ett gott syreutbyte (Wilson och Laurent, 2002).



Figur 1, Gälar från en annan sorts benfisk, tonfisk. Källa: [//commons.wikimedia.org/wiki/File:Tuna_Gills_in_Situ_cut.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tuna_Gills_in_Situ_cut.jpg) creative commons cc-by-sa 3.0 license.

Epiteliocystis

Epiteliocystis är ett tillstånd som påvisats hos över 50 olika fiskarter i världen (Nowak och LaPatra, 2006). Det karakteriseras av cystor i gälepitelet. Cystorna består av epitelceller som blir kraftigt förstörade på grund av en proliferation av bakterier intracellulärt. Subkliniska infektioner är vanliga men beroende på mängden cystor och värdens immunsvaret kan kliniska symptom uppstå. De infekterade epitelcellerna hypertrofierar och varierar i storlek från 10 till 400 μm (Mitchell and Rodger, 2011). Histologiskt ses cystorna som runda, basofila cystor som omringas av en eosinofil hyalinkapsel. I en prevalensstudie av Nowak och Clark (1999) observerades en spännvidd av olika vävnadssvar på cystor. Vanligt förekommande (i 56,4% av cystorna) var en minimal reaktion, med endast en inkapsling av cystan i ett tunt lager av platta epitelceller och därtill ofta en sammanfogning av lameller, beroende på storleken av cystan. I de fall där mer drastiska reaktioner kunde noteras var inflammation med infiltrering av leukocyter (35,5 %), epitelial hyperplasi (33,9 %) och proliferation av mucoida celler (21 %) vanliga svar (Nowak och Clark, 1999).

Kliniska symptom uppstår först när det skett en proliferation av värdjurets gälepitel och en överproduktion av mucus. Denna reaktion kallas ibland hyperinfektion (Mitchell and Rodger, 2011). På tidiga levnadsstadier har dock dödlighet noterats utan ett proliferativt värdsvar. Påverkade fiskar uppvisar bland annat letargi och respiratorisk stress, som visar sig genom ökad andningsfrekvens och kippande efter andan vid vattenytan (Rodger et al., 2011; Steinum et al., 2010). Mortalitet varierar kraftigt mellan arter, populationer och olika åldrar. Epiteliocystis

ingår i den multifaktoriella etiologin för proliferativ gälinflammation (PGI), en sjukdom som kännetecknas av respiratorisk påverkan och inflammation och proliferation i gälepitelet (Steinum et al., 2010).

När det gäller ekonomiska förluster för näringsidkaren kan respiratorisk påverkan leda till dålig tillväxt och döda fiskar. Cystor i gälarna är dock inte i sig något som innebär att laxen inte godkänns som livsmedel. Avlivning sker genom strupskärning och vid detta moment inspekteras fiskarna och en första gallring görs. Här inspekteras ej gälarna specifikt och endast fiskar med synliga sår, bölder eller andra tydliga tecken på infektioner gallras bort då. Vid rensning kontrolleras bukhålan och när fisken fileas kan ytterliga defekter upptäckas som kan leda till en nedklassning av slaktkroppen (Lönström 2019).

Prevalens

Prevalensen av epiteliocystis varierar kraftigt mellan olika länder och anläggningar. Steinum et al. (2010) undersökte PGI i norska laxodlingar. Prover togs från sötvattenkläckier och saltvattenanläggningar i sydvästra och mellersta Norge. Provtagning påbörjades i april och avslutades vid detektion av utbrott av PGI. Resultaten visade att sjukdomen kunde påvisas i 6 av 7 anläggningar i sydvästra Norge men inte i de andra. Den högsta uppmätta dödligheten var på 14% över en månadsperiod i en kasse på en av anläggningarna. Den ökade dödligheten sammanföll med en drastisk temperaturökning i vattnet. Histologiska analyser av gälarna kunde visa ett måttligt samband mellan klinisk sjukdom och epiteliocystis, epiteliocystis observerades i 66% av fiskarna med PGI och i 33% av fiskarna utan PGI. (Steinum et al., 2010)

Prevalensen på odlad atlantlax i Australien varierar mellan 0-20%, med den högsta prevalensen under sommarmånaderna (i Australien november till februari). Kliniska symptom kunde dock inte observeras i några av fiskarna (Nowak och Clark, 1999). Epiteliocystis har även observerats på vilda populationer. Guevara Soto et al. undersökte förekomst av epiteliocystis på både odlad och vild öring (*Salmo trutta*) i schweiziska vattendrag. De såg att åkomman var mer frekvent förekommande i odlade populationer men att intensiteten i infektionerna var högre i de vilda populationerna. Det var stora variationer i prevalens i odlingsanläggningarna och på de platser där vilda fiskar fångats in. (Guevara Soto et al., 2016)

Rodger et al. (2011) undersökte fyra laxodlingar i Irland där gälsjukdom noterats. Histologiska undersökningar av de påverkade fiskarna visade på en komplex etiologi, inklusive epiteliocystis, filamentösa bakteriehärdar kännetecknande för infektion med tenacibaculumbakterier och olika sorters ectoparasiter. Prevalensen och dödligheten varierade mellan de olika anläggningarna, men ökade generellt under sommarmånaderna. Som högst låg dödligheten totalt runt 50% i två av anläggningarna. De laxar som påverkades mest var från nordamerikanska stammar. På en av anläggningarna behandlades fisken med tetracykliner men med oklara resultat, i två av fyra bassänger minskade dödligheten men i de två andra fortsatte den öka. Hur viktig roll epiteliocystis spelar för dödligheten i dessa fall är svårt att avgöra (Rodger et al., 2011).

Klamydiabakterier

Identifikation av agens

Innan analyser hade gjorts på cystorna i gälepitelet misstänkte forskare att tillståndet orsakades av antingen rickettsiabakterier eller klamydiabakterier. Nylund et al. (1998) utförde

morfologiska studier på cystorna. De kunde då detektera gramnegativa intracellulära bakterier som visade sig i tre distinkta utvecklingsstadier, retikulärkroppar (RB), intermediärkroppar (IB) och elementärkroppar (EB). De intracellulära bakterierna observerades som membranbundna vacuoler i epitelcellerna. Nukleinsyran i IB och EB var kondenserad till nukleotider medan nukleinsyran i RB var ordnad i kromatinsträngar. Dessa fynd stämmer överens med bakterier från klamydiasläktet (Nylund et al., 1998).

Chlamydiae

Klamydiabakterier är obligat anaeroba bakterier som tillhör ett eget fylum, *Chlamydiae*, då de skiljer sig från andra bakterier i stor grad. Klamydiabakterier har en unik utvecklingscykel som är uppdelad i två faser. Den första fasen är extracellulär, bakterier i den fasen är infektiösa och kallas då elementärkroppar. De infekterar eukaryota celler genom endocytos och ligger sedan inuti cellen i vesiklar i cytoplasman. Därefter går de in i den andra fasen, och blir intracellulära vegetativa retikulärkroppar som kan dela sig. När cellerna delat sig ett flertal gånger differentierar de tillbaka till elementärkroppar, varpå vesikeln fuserar med membranet och elementärkropparna kan då infektera nya celler (Elwell et al., 2016) (SLU UtbildningsMedia, 2015). Bakterierna är svåra att odla då de endast förökar sig intracellulärt. Det begränsar möjligheterna för experimentella studier och metoder för diagnostik och gör att det är svårt att verifiera nya arter av klamydia (Nowak och LaPatra, 2006).

Nya arter under ordningen Chlamydiales

För att identifiera agens till Epteliocystis har flera studier genomförts där analyser har gjorts av material som insamlats från fiskar som uppvisat cystor i gälepitelet. Draghi et al. (2004) kunde på så sätt identifiera och karakterisera en eventuell ny art av klamydialika organismer (CLO) som återfanns i gälarna på saltvattenodlad atlantlax både i Irland och i Norge. Prover som togs från epiteliala lesioner analyserades med histopatologi, elektronmikroskopering, in situ-hybridisering och DNA-extrahering. Resultaten från analyserna visade att genetiskt material från populationerna i Norge och Irland stämde överens till 99% vilket indikerar att fiskarna i de olika populationerna var infekterade med samma art. Släktskapsanalyser placerade denna art under ordningen *Chlamydiales* och den gavs namnet *candidatus Piscichlamydia salmonis* (Draghi et al., 2004). Candidatus används inom taxanomin av prokaryoter för att beskriva nya potentiella arter som inte har kunnat odlas ("International Code of Nomenclature of Prokaryotes," 2019). På liknande sätt kunde Karlsen et al. (2008) identifiera ytterligare en ny art av CLO, denna gång i sötvattenuppfödd lax. De tog prover från tre olika atlantlaxpopulationer i Norge och DNA-amplifiering av dessa prover visar överensstämmelse på 99,5% mellan populationerna. Karlsen et al. föreslår namnet *candidatus Clavochlamydia salmonicola*, som uppvisar över 80% släktskap med bakterier inom ordningen *Chlamydiales* (Karlsen et al., 2008).

En nyupptäckt betaproteobakterie

Inte bara klamydiabakterier har detekterats i samband med epitelocystis på lax. Toenshoff et al (2012) utförde ytterligare en studie för att kartlägga agens kopplade till epitelocystis. De samlade in prover under våren 2007 från 15 laxar från en population av havsodlad atlantlax i sydvästra Norge. Laxarna som valdes ut för provtagning påvisade respiratorisk påverkan. PCR-undersökningar som syftade till att upptäcka *Ca. P. Salmonis* gjordes och resultaten visade inget samband mellan mängd bakterier och mängd cystor. Resultaten tyder på att det måste finnas

fler agens närvarande som orsakar sjukdomen. Ytterligare analyser visade att inga andra arter ur klamydiasläktet kunde påvisas. Vad de istället kunde påvisa med bredare PCR-analyser var en bakterie som tycktes ha släktskap (88%) med kända betaproteobakterier. Ett mycket nära släktskap (99,2) med bakterier som detekterats av Steinum et al. (2009) kunde konstateras. Denna bakterie skiljde sig från tidigare kända betaproteobakterier i så hög grad att det blev relevant att placera den i ett nytt genus. Det föreslagna namnet för den nya arten är *Candidatus Branchiomonas cisticola* (Toenshoff et al., 2012).

Efter upptäckten av en ny bakterie ville Mitchell et al. (2013) undersöka prevalensen av *Ca. B. cisticola* i laxodlingar i Norge och Irland, och använde arkiverat material från 14 norska och 3 irländska odlingar. Materialet var insamlat under höstarna 2004–2010. Materialet analyserades histologiskt, med PCR och in situ-hybridisering. Resultaten visar att bakterien kunde detekteras i en stor andel av de laxar som testades, både i sjuka och till synes friska djur. Ett statistiskt signifikant samband kunde ses mellan antalet cystor och mängden bakterier. Dessa resultat indikerar att *Ca. B. cisticola* skulle ha en större roll i utvecklingen av epiteliocystis än exempelvis *Ca. P. salmonis* (Mitchell et al., 2013).

Spridning

Horisontell överföring

Direkt horisontell överföring av *Ca. B. cisticola* och *Ca. P. salmonis* kunde konstateras i studier av Wiik-Nielsen et al. (2017) Kliniskt friska juvenila laxar fick leva i en tank med sötvatten som kom från en tank där sjuka juvenila laxar levde. I de sjuka laxarna hade *Ca. B. cisticola*, *Ca. P. salmonis* och Atlantic salmon gill pox virus (SGPV) detekterats. Prover på de tidigare friska fiskarna togs dag 0, 30 och 65 från introduktionen. Studien visade att *Ca. B. cisticola* överfördes i hög grad via vatten från sjuka till friska laxar. 29 av 30 testade fiskar hade detekterbara nivåer av bakterien i slutet av studien. *Ca. P. salmonis* kunde upptäckas i 6 av 30 testade fiskar (Wiik-Nielsen et al., 2017).

Miljöfaktorer

Studier har gjorts på vilda laxpopulationer för att undersöka om klamydiainfektioner kan orsakas av miljöfaktorer. Schmidt-Posthaus et al. (2012) undersökte öringpopulationer från sju olika platser i ett schweiziskt flodsystem och följde dessa under 18 månader. Resultaten visade att epiteliocystis återfanns på specifika platser, och var som mest prevalent under de varmaste sommarmånaderna. Inga bevis kunde påträffas för att infektionen persisterade i populationerna, vilket indikerar att det finns miljöfaktorer som introducerar infektionen i populationen. För första gången identifierades både *candidatus Piscichlamydia salmonis* och *candidatus Clavochlamydia salmonicola* i samma populationer, och ibland även som blandinfektioner. Då det inte finns några produktionsställen i dessa vattendrag samt att dessa floder inte är i nära kontakt med havet indikerar dessa fynd att infektionerna kan ha ursprung i sötvattenmiljöer (Schmidt-Posthaus et al., 2012). Det nära släktskapet mellan *Ca. P. salmonis* och tidigare kända klamydiabakterier som identifierats som endosymbionter till *Acanthamoeba* (Draghi et al., 2004) indikerar att bakterien skulle kunna ha amöbor som naturliga värdar.

I en annan studie som också utfördes i Schweiz av Guevara Soto et al. (2017) observerades ett tydligt säsongsmönster i prevalensen av epiteliocystis på vild öring. Prevalens och infektionsintensitet var som högst i september och ingen förekomst av varken *Ca. P. salmonis*

eller *Ca. C. salmonicola* kunde detekteras under juni månad. Resultaten tyder på att bakterierna övervintrar i naturliga värdar i miljön för att åter infektera fiskpopulationer under sommarmånaderna. De kunde dock inte se ett samband mellan prevalens och vattentemperatur (Guevara Soto et al., 2017). I sin prevalensstudie studerade Nowak och Clark (1999) även epiteliocystis på de juvenila fiskarna som ännu inte flyttats från sötvatten till saltvatten men gjorde inga positiva fynd. Det indikerar att sjukdomen finns naturligt i saltvattenmiljön (Nowak och Clark, 1999).

Putsarfiskar

Putsarfiskar som en potentiell smittväg är något som forskare har tittat närmare på. I Norge förekommer laxlöss i nästan alla anläggningar och parasiten har stor betydelse då den kan orsaka stora produktionsförluster (Norska veterinärinstitutet, u.å.). En metod för att behandla och minska förekomsten av laxlus inom odlingen är att använda sig av putsarfiskar. Steigen et al. (2018) utförde en studie med syfte att identifiera patogena agens i gälarna på fem olika arter av putsarfiskar och därigenom få insikt i om putsarfiskar kan bidra till smittspridning i laxodlingar. Studien visade förekomst av klamydiabakterier i alla fem fiskarter. De klamydiaarter som detekterades har dock inte hittats på laxfiskar och inga av de kända potentiella epiteliocystisagens som setts på laxfisk kunde påvisas på putsarfiskarna. Studien tyder därmed på att putsarfiskar inte är en smittväg för epiteliocystis på laxfisk. (Steigen et al., 2018). Generellt visar studier på att de bakterier som identifierats i samband med epiteliocystis är artspecifika och därmed endast smittar inom en art, vilket också talar emot att putsarfiskar skulle kunna vara reservoarer för de bakterier som orsakar sjukdom på lax (Blandford et al., 2018).

Behandling

Antibiotika

Epiteliocystis har framgångsrikt behandlats med tetracykliner på öringabborre (*Micropterus salmoides*) i ett försök av Goodwin et al. (2005). Där behandlades fiskarna med tetracykliner som distribuerades i vattnet två gånger dagligen i tre dagar, och dödligheten minskade kraftigt den tredje behandlingsdagen. När histologiska tester utfördes två veckor efter testet kunde ingen epiteliocystis observeras (Goodwin et al., 2005). Det blev dock inte identifierat vilka agens som infekterade fiskarna och det är därför svårt att dra slutsatser kring effektiviteten av behandlingen. Inga studier har kunnat hittas som visar att tetracykliner är optimal behandling av epiteliocystis på laxfisk. Generellt finns det begränsat med litteratur angående behandlingsmetoder.

Om antibiotika ska användas behöver hänsyn tas för att minimera resistensutveckling och påverkan på vilda populationer. I Norge användes 2017 641 kg antibiotika (fiskehelsesrapporten 2017). Antalet recept utskrivna till odlingar av laxarter stod bara för 19% av totala antalet recept under 2017, däremot står lax för en stor andel av behandlad fisk sett till massa. Bakterier med resistensgener har hittats i anslutning till odlingsställen och resistensen är i hög grad kopplad till den antibiotika som använts (Gao et al., 2012). Däremot har forskning visat att resistensgener inte sprids från odlingsstället i någon stor utsträckning (Muziasari et al., 2014). Antibiotikaresistens i akvatiska miljöer är framför allt kopplat till andra källor för antibiotika, exempelvis läkemedelstillverkning och gödsel och annat avfall från annan animalieproduktion.

Probiotika

På senare år har probiotika börjat användas inom akvakultur som ett sätt att förbättra fiskhälsan och därmed minska behovet av behandling med bland annat antibiotika (Chauhan och Singh, 2019). Probiotika är bakterier som till skillnad från patogener ska hjälpa värden. Ofta används de i förebyggande syfte att förbättra tarmfloran och därmed få ett bättre utbyte från fodret men de kan också användas för att konkurrera ut patogena bakterier i omgivningen. Probiotika kan också användas för att förbättra vattenkvalitet genom att omvandla kväve till koldioxid. Höga kvävehalter är ofta ett problem när mycket fisk produceras på liten yta (Bandyopadhyay och Das Mohapatra, 2009).

DISKUSSION

Epiteliocystis har identifierats på flera olika laxarter världen över i både vilda och odlade populationer. I den studerade litteraturen har det inte funnits en enighet kring vilken betydelse epiteliocystis har för djurhälsan och näringen. Då epiteliocystis ingår i den multifaktoriella etiologin för PGI är det inte uppenbart hur mycket epiteliocystis bidrar till dödligheten men dödlighet i PGI har setts på flera odlingar, dock endast på norra halvklotet. Epiteliocystis har påvisats på fiskar i odlingar i bland annat Australien men där kunde inte några kliniska symptom ses på fiskarna (Nowak och Clark, 1999). Huruvida det finns problem kopplade till epiteliocystis i andra odlingar är inte klarlagt. Det är heller inte konstaterat vad som orsakar hyperinfektion i vissa fiskar och därmed finns ännu inga metoder för att förhindra detta.

Agens

Hittills har tre olika bakteriella agens kunnat kopplas till epiteliocystis, *Ca. P. salmonis*, *Ca. C. salmonicola* och *Ca. B. cisticola*. Av dessa har tydligast samband påvisats mellan infektionsintensitet och mängd bakterier för *Ca. B. cisticola*. Fynden tyder på att framför allt klamydiaarterna skulle kunna vara opportunisterna snarare än strikta patogener och att någon ännu inte identifierad faktor skulle kunna utlösa sjukdomstillståndet.

Prevalens och spridning

I flera studier har det setts samband mellan säsong och prevalens. I Irland, Norge och Australien var förekomsten som störst under sommarmånaderna bland den odlade fisken. I de vilda populationerna i Schweiz observerades en tydlig säsongsvariation där ingen epiteliocystis kunde identifieras på vintern men där cystorna återkom under sommaren årligen. En förhöjd vattentemperatur hade påverkan på dödligheten i PGI i Norge men sambandet mellan just vattentemperatur och dödlighet eller prevalens har inte varit lika tydligt i andra studier.

Resultat från forskning tyder på att bakterierna som orsakar epiteliocystis återfinns naturligt i vattenmiljön. *Ca. C. Salmonicola* har bara hittats i sötvatten men sågs i Schweiz i områden långt från odlingsanläggningar. *Ca. P. Salmonis* har påträffats i både vilda populationer i sötvatten och i odlingar i havet, men inte i de sötvattenkläckerier som de odlade fiskarna kommer från. Både *Ca. B. cisticola* och *Ca. P. salmonis* överförs horisontellt mellan fiskar.

Antibiotikaanvändning på fisk

Om det i framtiden skulle forskas fram en effektiv antibiotikabehandling mot epiteliocystis är det av största vikt att behandlingen görs på ett ansvarsfullt sätt. Även om resistensen inte sprids i miljön i stor grad kan det bli svårare att behandla de odlade populationerna om resistensgener persisterar i närmiljön. För att hålla nere användningen är det viktigt att inte ha för hög densitet i kassarna då hög densitet ökar infektionstrycket. Om forskning visar att probiotika kan användas för att minska förekomst av epiteliocystis är det också ett alternativ till antibiotikabehandling.

Begränsad forskning i ett fåtal länder

Majoriteten av all laxodling (94,6 %) finns i endast fem länder. Av dessa är Norge störst och Chile kommer på andra plats. Därför är forskningen på detta område koncentrerad till dessa

länder. Det finns lite information om epiteliocystis på lax i chilenska odlingar. Detta skulle kunna bero på att de i Chile haft stora problem med infektiös laxanemi (Asche et al., 2009) vilka har lett till en minskad produktion med 75% mellan 2005 och 2010. Denna kris har sannolikt blivit fokus för en stor del av forskningen. I övrigt har den forskning denna studie fokuserat på kommit från i huvudsak Norge, Irland, Schweiz och Australien, vilket inte varit ett aktivt val utan det har varit den information som funnits att tillgå. Det är naturligt att forskning kring laxsjukdomar bedrivs i de länder där det finns en stor näring, men om forskningen bedrevs i fler länder och på fler vilda populationer skulle det kunna medföra nya perspektiv och mer data att analysera. Då epiteliocystis är studerat på så många olika arter kan det också vara en möjlighet att titta på liknande forskning på andra benfiskar och utgå från den i framtida studier.

Det finns i dagsläget mycket kvar att undersöka när det gäller epiteliocystis på laxfiskar. Vilka är de naturliga värdarna för de bakteriella agens som orsakar epiteliocystis? Vilka omständigheter orsakar hyperinfektioner? Varför syns kliniska infektioner framför allt på norra halvklotet? Finns det någon effektiv behandling och kan probiotika användas för att förhindra infektioner? Vi vet idag inte vilken betydelse epiteliocystis har för laxnäringen men med ökad kunskap kan vi förhoppningsvis se till att det inte utvecklas till ett större problem i framtiden.

LITTERATURFÖRTECKNING

Artdatabanken. *Salmo salar* - Lax <https://artfakta.artdatabanken.se/taxon/100126> [2019-02-22]

Asche, F., Roll, K. H., Sandvold, H. N., Sørvig, A., & Zhang, D. (2013) Salmon aquaculture: larger companies and increased production, *Aquaculture Economics & Management*, 17:3, 322–339

Asche, F., Hansen, H., Tveterås, R., Tveterås, S. (2009) The Salmon Disease Crisis in Chile. *Marine Resource Economics*, 24(4), 405–411.

Bandyopadhyay, P., Das Mohapatra, P.K. (2009), Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 467–478

Blandford, M.I., Taylor-Brown, A., Schlacher, T.A., Nowak, B., Polkinghorne, A. (2018) Epitheliocystis in fish: An emerging aquaculture disease with a global impact. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 1436–1446.

Chauhan, A., Singh, R. (2019) Probiotics in aquaculture: a promising emerging alternative approach. *Symbiosis* 77, 99–113.

Draghi, A., Popov, V.L., Kahl, M.M., Stanton, J.B., Brown, C.C., Tsongalis, G.J., West, A.B., Frasca, S. (2004) Characterization of “*Candidatus Piscichlamydia salmonis*” (Order *Chlamydiales*), a Chlamydia-Like Bacterium Associated With Epitheliocystis in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5286–5297.

Elwell, C., Mirrashidi, K., Engel, J. (2016) Chlamydia cell biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 14, 385–400.

FAO (2018) *Fao yearbook. Fishery and aquaculture statistics 2016*. (<http://www.fao.org/3/i9942t/I9942T.pdf>)

Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., Xu, L. (2012) Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *Water Research* 46, 2355–2364.

Goodwin, A.E., Park, E., Nowak, B.F. (2005) Successful treatment of largemouth bass, *Micropterus salmoides* (L.), with epitheliocystis hyperinfection. *Journal of Fish Diseases* 28, 623–625

Guevara Soto, M., Vidondo, B., Vaughan, L., Rubin, J.-F., Segner, H., Samartin, S., Schmidt-Posthaus, H. (2017) Investigations into the temporal development of epitheliocystis infections in brown trout: a histological study. *Journal of Fish Diseases* Oxford 40, 811–819

Guevara Soto, M., Vidondo, B., Vaughan, L., Seth-Smith, H.M., Nufer, L., Segner, H., Rubin, J.-F., Schmidt-Posthaus, H. (2016) The emergence of epitheliocystis in the upper Rhone region: evidence for *Chlamydiae* in wild and farmed salmonid populations. *Archives of Microbiology* 198, 315–324

Havforskningsinstituttet (2009-08-14) *Laks i oppdrett* https://www.imr.no/temasider/fisk/laks/laks_i_oppdrett/nb-no [2019-03-13]

International Code of Nomenclature of Prokaryotes (2019) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69, S1–S111

Karlsen, M., Nylund, A., Watanabe, K., Helvik, J.V., Nylund, S., Plarre, H. (2008) Characterization of “*Candidatus Clavochlamydia salmonicola*”: an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environmental Microbiology* 10, 208–218

Mitchell, S., Steinum, T., Toenshoff, E., Kvellestad, A., Falk, K., Horn, M., Colquhoun, D. (2013) ‘*Candidatus Branchiomonas cysticola*’ is a common agent of epitheliocysts in

- seawater-farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway and Ireland. *Inter-research Diseases of Aquatic Organisms* 103, 35–43. <https://doi.org/10.3354/dao02563>
- Mitchell, S.O., Rodger, H.D. (2011) A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* 34, 411–432
- Muziasari, W.I., Managaki, S., Pärnänen, K., Karkman, A., Lyra, C., Tamminen, M., Suzuki, S., Virta, M. (2014) Sulphonamide and Trimethoprim Resistance Genes Persist in Sediments at Baltic Sea Aquaculture Farms but Are Not Detected in the Surrounding Environment. *PLOS ONE* 9, e92702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092702>
- Norska veterinærinstituttet, *Lakselus*, <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/lakselus>, [19-02-23]
- Nowak, B.F., Clark, A. (1999) Prevalence of epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 22, 73–78.
- Nowak, B.F., LaPatra, S.E. (2006) Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases* 29, 573–588.
- Nylund, A., Kvenseth, A.M., Isdal, E. (1998) A Morphological Study of the Epitheliocystis Agent in Farmed Atlantic Salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 43–55.
- Rodger, H.D., Murphy, K., Mitchell, S.O., Henry, L., 2011. Gill disease in marine farmed Atlantic salmon at four farms in Ireland. *Vet. Rec.* 168, 668–668. <https://doi.org/10.1136/vr.d3020>
- Schmidt-Posthaus, H., Polkinghorne, A., Nufer, L., Schifferli, A., Zimmermann, D.R., Segner, H., Steiner, P., Vaughan, L., 2012. A natural freshwater origin for two chlamydial species, *Candidatus Piscichlamydia salmonis* and *Candidatus Clavochlamydia salmonicola*, causing mixed infections in wild brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Microbiology* 14, 2048–2057.
- SLU UtbildningsMedia (2015). *Klamydia* [video] <https://www.youtube.com/watch?v=3bC5o6W1q38&t=2s> [2019-03-02]
- Statistisk sentralbyrå Norge (2018-10-25) *Akvakultur, 2017, endelige tall*, <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar/2018-10-25> [2019-03-18]
- Steigen, A., Nylund, A., Plarre, H., Watanabe, K., Karlsbakk, E., Brevik, O. (2018) Presence of selected pathogens on the gills of five wrasse species in western Norway. *Inter-research Diseases of Aquatic Organisms* 128, 21–35.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J., Heum, M., Mohammad, S., Grontvedt, R.N., Falk, K. (2010) Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Inter-research Diseases of Aquatic Organisms* 91, 201–211. <https://doi.org/10.3354/dao02266>
- Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Mitchell, S.O., Steinum, T., Falk, K., Colquhoun, D.J., Horn, M. (2012) A Novel Betaproteobacterial Agent of Gill Epitheliocystis in Seawater Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLOS ONE* 7, e32696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032696>
- Wiik-Nielsen, J., Gjessing, M., Solheim, H.T., Litlabø, A., Gjevre, A.-G., Kristoffersen, A.B., Powell, M.D., Colquhoun, D.J. (2017) *Ca. Branchiomonas cysticola*, *Ca. Piscichlamydia salmonis* and Salmon Gill Pox Virus transmit horizontally in Atlantic salmon held in fresh water. *Journal of Fish Diseases* 40, 1387–1394.
- Wilson, J. M., Laurent, P. (2002) Fish Gill Morphology: Inside Out. *Journal of Experimental Zoology* 293, 192–213

Icke publicerat material

Lasse Lönnström, Nordic trout, 2019-03-11